

УДК 577.3

## ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ПРИ ГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

© 2022 г. В.В. Войнаровский\*, Г.Г. Мартинович\*, #

\*Белорусский государственный университет, просп. Независимости, 4, Минск, 220030, Республика Беларусь

# E-mail: martinovichgg@bsu.by

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 03.06.2022 г.

Принята к публикации 22.06.2022 г.

С использованием численного моделирования и спектрофотометрического анализа исследованы механизмы регуляции адаптации эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе наночастицами серебра. Показано, что наночастицы серебра индуцируют гемолиз эритроцитов, скорость которого зависит от суммарной концентрации серебра и содержания ионов в растворе. Гемолиз эритроцитов нитратом серебра протекает в два раза быстрее, чем наночастицами. Обнаружено, что пероксид водорода повышает структурную устойчивость эритроцитов при гемолизе наночастицами серебра и нитратом серебра. Диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение доли негемолизированных клеток (область гормезиса), зависит от времени разрушения клеток при действии повреждающего фактора. Максимум гормезиса при разрушении наночастицами серебра наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ, а при разрушении нитратом серебра – при 700 мкМ. С помощью численного моделирования установлено, что зависимость максимума гормезиса от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования обусловлена динамическим характером цитоплазматических механизмов, регулирующих соотношение мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина.

*Ключевые слова:* гормезис, адаптация, пероксид водорода, эритроциты, метгемоглобин, наночастицы серебра.

DOI: 10.31857/S0006302922050076, EDN: JHJGL

Способность адаптироваться к стрессу является важнейшей характеристикой здорового организма [1]. Однако защитно-адаптационные механизмы на уровне клеток изучены недостаточно. Ключевыми участниками регуляции ответа клеток на действие стрессовых факторов являются активные формы кислорода (АФК) – высокореакционные продукты метаболизма кислорода, обладающие широким спектром физиологического и патофизиологического действия [2]. К АФК относятся различные химические соединения, включая синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), супероксидный ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) и гидроксильный ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) радикалы, пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и другие.

Основной молекулой группы АФК, осуществляющей передачу регуляторных сигналов, является пероксид водорода [3]. Сигналы, передаваемые пероксидом водорода, характеризуются своим концентрационным порогом активации и длительностью. Действие таких сигналов обратимо и регулируется многокомпонентной антиоксидантной системой в результате сопряженного функционирования специализированных белков, таких как каталаза (Cat), глутатионпероксидаза (Gpx), пероксиредоксин (Prx) и др. [2].

В последние годы выяснено, что регуляция экспрессии генов белков антиоксидантной системы клеток млекопитающих осуществляется фактором транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), активность которого контролируется с участием редокс-зависимого белка Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) [4]. Система Keap1-Nrf2 играет ключевую роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза при стрессовых воздействиях и рассматривается как потенциальная мишень для терапии широкого спектра заболеваний [5, 6]. Однако в эритроцитах, самых многочисленных клетках крови человека, данная систе-

*Сокращения:* АФК – активные формы кислорода, Cat – каталаза, Gpx – глутатионпероксидаза, Prx – пероксиредоксин, NADH – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма),  $\text{NAD}^+$  – никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма), NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма),  $\text{NADP}^+$  – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма), B3 – белок полосы 3, MetHb – метгемоглобин, FerHb – феррилгемоглобин.

ма поддержания редокс-гомеостаза отсутствует, и защита клеток при стрессовых воздействиях осуществляется цитоплазматическими механизмами, включающими регуляцию функционального состояния белков и их взаимодействий с мембраной и цитоскелетом клетки.

Важнейшим механизмом защиты эритроцитов является повышение структурной стабильности мембраны при связывании ее компонентов с гемоглобином — основным белком эритроцитов [7]. Константы скорости образования и распада мембранных комплексов гемоглобина зависят от окисленного состояния белка [8, 9]. Взаимодействие метгемоглобина с компонентами мембраны характеризуется более высокой константой связывания, чем связывание оксигемоглобина. Показано, что обратимое связывание метгемоглобина с белками цитоскелета оказывает стабилизирующее действие на эритроцитарные мембраны [10, 11]. Восстановление метгемоглобина никотинамидадениндинуклеотидом (NADH), катализируемое цитохромом b5, приводит к снижению количества мембранных комплексов белка [12]. Накопление более окисленной формы гемоглобина — феррилгемоглобина усиливает процессы перекисного окисления липидов и снижает структурную стабильность мембран [13]. Механизмы изменения баланса окисленных форм гемоглобина и их связывания с мембраной при действии внешних стрессовых факторов до сих пор не изучены.

Ранее нами было показано, что соотношение мембранных комплексов различных окисленных форм гемоглобина определяет гормезисную зависимость ответа эритроцитов на действие пероксида водорода: регуляторное при низких концентрациях и повреждающее при высоких [14]. Диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение структурной стабильности мембраны (область гормезиса), зависит от ряда внутренних и внешних факторов.

Значительный рост объемов производства новых материалов, содержащих наноразмерные частицы, и расширение областей их применения актуализировало исследования механизмов взаимодействия искусственных наноматериалов и биологических систем. Широкое применение находят наночастицы серебра, которые используются в качестве бактерицидных, противовирусных, противогрибковых и антисептических агентов, однако способны проявлять токсические свойства по отношению к клеткам млекопитающих и человека [15]. Поскольку при действии на-

ночастиц серебра может изменяться концентрация пероксида водорода, в настоящей работе изучены условия и механизмы защитного действия окислителя при повреждении эритроцитов наночастицами серебра.

Разрушение клеток под действием наночастиц серебра обусловлено, в основном, ионами серебра, высвобождаемыми наночастицами [16, 17], и зависит от ряда факторов, включая внеклеточные и внутриклеточные редокс-условия [18]. Для количественного анализа влияния различных факторов на действие пероксида водорода в эритроцитах построена математическая модель, в которой передача сигнала с участием пероксида водорода и образование мембранных комплексов окисленных белков рассматривается как цепь взаимосвязанных событий.

### ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Повышение структурной стабильности мембран эритроцитов, индуцируемое пероксидом водорода, усиливает защитные свойства клеток и, следовательно, уменьшает количество разрушенных при гемолизе клеток. При моделировании индуцированного наночастицами гемолиза эритроцитов считается, что скорость разрушения клеток пропорциональна количеству клеток в суспензии и количеству высвобождаемых наночастицами ионов серебра, вызывающих разрушение. Скорость высвобождения ионов серебра, в свою очередь, прямо пропорциональна количеству ионов, заключенных в наночастицы, и зависит от защитных свойств клеток. В этом случае скорость изменения количества клеток в суспензии регулируется двумя конкурирующими процессами (защиты и разрушения) и может быть описана следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -k_p \cdot n \cdot [Ag^+] \\ \frac{d[Ag^+]}{dt} = \frac{1}{k_3} \cdot [Ag^0] \\ \frac{d[Ag^0]}{dt} = -\frac{1}{k_3} \cdot [Ag^0] \end{cases}, \quad (1)$$

где  $n$  — число клеток в суспензии,  $k_p$  — коэффициент разрушения,  $k_3$  — коэффициент защиты,  $[Ag^+]$  — концентрация высвобожденных ионов серебра в растворе,  $[Ag^0]$  — концентрация ионов серебра в форме наночастиц. Суммарная концентрация серебра считается постоянной.

Решением системы (1) является уравнение:

$$n(t) = n(0) \cdot \exp([Ag^0](0) \cdot k_p \cdot (k_3 - k_3 \cdot \exp(-\frac{t}{k_3}) - t)), \quad (2)$$

где  $n(0)$  – начальное количество клеток в суспензии,  $[Ag^0](0)$  – начальная концентрация ионов серебра, которая была использована при синтезе наночастиц,  $t$  – время. Значения коэффициентов  $k_p$  и  $k_3$  определяли на основе экспериментально полученных зависимостей гемолиза эритроцитов с использованием метода наименьших квадратов.

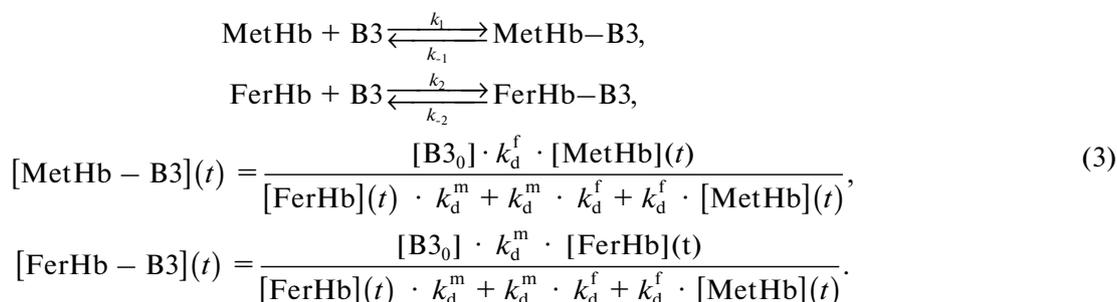
Защитные свойства клеток при гемолизе определяются структурной стабильностью мембраны и характеризуются коэффициентом защиты  $k_3$ . На основании ранее проведенных исследований [14] в модели полагается, что структурная стабильность мембраны зависит от количества мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина и изменяется со временем.

Для количественного анализа динамики изменения защитных свойств клетки рассматривали ключевые этапы образования метгемоглобина и феррилгемоглобина и их связывания с мембраной при действии внеклеточного пероксида водорода на основе математической модели, описанной нами ранее [14]. Для учета влияния наночастиц серебра в модели сделаны ряд изменений.

В новой модели введено упрощение полной системы гликолиза и пентозофосфатного пути, основанное на условии стационарного состояния потоков [19]. При определении скорости восстановления NADPH и NADH учитывается скорость транспорта глюкозы через мембранный транспортер GLUT1 (мембранный транспортер глюко-

зы типа 1 – Glucose transporter 1). Считается, что при окислении одной молекулы глюкозы восстанавливаются две молекулы  $NAD^+$  или две молекулы  $NADP^+$ . Снижение поступления источника энергии (глюкозы) приводит к истощению пула NADPH и NADH и изменяет скорость гликолиза или пентозофосфатного пути пропорционально концентрации пиридиннуклеотидов. Таким образом, в новой модели учитываются не общие скорости гликолиза или пентозофосфатного пути, а только их отклонения от начального значения.

Индукцированное пероксидом водорода образование метгемоглобина и феррилгемоглобина приводит к их связыванию с компонентами мембраны эритроцита. Динамика образования мембранных комплексов окисленных форм гемоглобина описывается кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия, где в качестве лиганда выступает окисленный гемоглобин, а рецептором служит мембранный белок полосы 3 (B3). Достижение равновесия процессов связывания и распада комплексов на мембране происходит значительно быстрее процессов восстановления окисленных белков, поэтому в модели рассматривается стационарное состояние формирующихся комплексов. Количество мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина зависит соответственно от количества метгемоглобина и феррилгемоглобина в цитоплазме:



где  $[\text{B3}]$  – концентрация доступных для связывания белков полосы 3,  $[\text{B3}_0]$  – суммарная концентрация белков полосы 3,  $[\text{MetHb}]$  – концентрация метгемоглобина в клетке,  $[\text{MetHb-B3}]$  – концентрация мембранных комплексов метгемоглобина,  $[\text{FerHb}]$  – концентрация феррилгемоглобина в клетке,  $[\text{FerHb-B3}]$  – концентрация мембранных комплексов феррилгемоглобина,  $k_d^f$  – константа диссоциации комплексов феррилгемоглобина,  $k_d^m$  – константа диссоциации комплексов метгемоглобина.

Построенная математическая модель является нелинейной и содержит 17 дифференциальных уравнений. В табл. 1 и 2 приведены эти уравнения и их константы. Все константы и начальные условия взяты из литературных источников. Выполнен анализ на устойчивость системы. Численное решение системы выполнено в программе Wolfram Mathematica.

На основе численного моделирования изучено влияние пероксида водорода на динамику изменения мембраносвязанного состояния окисленных форм гемоглобина при действии разных повреждающих факторов.

Таблица 1. Реакции и уравнения скорости в модели

№	Реакция и уравнение скорости	Значение констант	Ссылка
1	$H_2O_2$ (внешн) $\rightarrow H_2O_2$ $v_1 = -P \cdot ([H_2O_2] - [H_2O_2(\text{внешн})]) \cdot \frac{S_{\text{клет}}}{V} \cdot N_{\text{клет}}$	$P = 6 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ $S_{\text{клет}} = 1.09 \cdot 10^{-10} \text{ М}^2$ $V = 10^{-6} \text{ М}^3$ $N_{\text{клет}} = 3 \cdot 10^7$	[20]
2	$H_2O_2$ (внешн) $\rightarrow H_2O_2$ $v_2 = -P \cdot ([H_2O_2] - [H_2O_2(\text{внешн})]) \cdot \frac{S_{\text{клет}}}{V_{\text{клет}}}$	$P = 6 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ $S_{\text{клет}} = 1.09 \cdot 10^{-10} \text{ М}^2$ $V_{\text{клет}} = 6.3 \cdot 10^{-17} \text{ М}^3$	[20]
3	$H_2O_2 + \text{Cat} \rightarrow H_2O + \text{CompI}$ $v_3 = k_3 \cdot [\text{Cat}] \cdot [H_2O_2]$	$k_3 = 6 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[21]
4	$H_2O_2 + \text{CompI} \rightarrow H_2O + O_2 + \text{Cat}$ $v_4 = k_4 \cdot [\text{CompI}] \cdot [H_2O_2]$	$k_4 = 1.6 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[21]
5	$H_2O_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{Gpx}} 2H_2O + \text{GSSG}$ $v_5 = \frac{[\text{Gpx}] \cdot [\text{GSH}] \cdot [H_2O_2]}{K_1 \cdot [H_2O_2] + K_2 \cdot [\text{GSH}]}$	$[\text{Gpx}] = 1.4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ $K_1 = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}$ $K_2 = 2.4 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}$	[22]
6	$2\text{Hb} + H_2O_2 \rightarrow 2\text{MetHb} + H_2O$ $v_6 = k_6 \cdot [\text{Hb}] \cdot [H_2O_2]$	$k_6 = 100 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[21]
7	$\text{MetHb} + H_2O_2 \rightarrow \text{FerHb} + H_2O$ $v_7 = k_7 \cdot [\text{MetHb}] \cdot [H_2O_2]$	$k_7 = 98 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[23]
8	$\text{MetHb} + \text{cytb5(восст)} \rightarrow \text{Hb} + \text{cytb5(окисл)}$ $v_8 = k_8 \cdot [\text{MetHb}] \cdot [\text{cytb5(восст)}]$	$k_8 = 6200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[24]
9	$\text{NADH} + \text{cytb5(окисл)} \xrightarrow{\text{cytb5R}} \text{NAD}^+ + \text{cytb5(восст)}$ $v_9 = \frac{k_9 \cdot [\text{cytb5R}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{cytb5(окисл)}]}{(K_M^{\text{NADH}} + [\text{NADH}]) \cdot (K_M^{\text{cytb5(окисл)}} + [\text{cytb5(окисл)}])}$	$k_9 = 418 \text{ с}^{-1}$ $[\text{cytb5R}] = 7 \cdot 10^{-8} \text{ М}$ $K_M^{\text{NADH}} = 3.1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ $K_M^{\text{cytb5(окисл)}} = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	[24]
10	$\text{FerHb} + 2\text{Asc} \rightarrow \text{MetHb} + \text{DHA} + \text{Asc}$ $v_{10} = k_{10} \cdot [\text{FerHb}] \cdot [\text{Asc}]$	$k_{10} = 400 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[23]
11	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{DHAR}} \text{Asc} + \text{GSSG}$ $v_{11} = \frac{k_{11} \cdot [\text{DHAR}] \cdot [\text{DHA}] \cdot [\text{GSH}]}{[\text{DHA}] \cdot [\text{GSH}] + K_{\text{DHA}} \cdot [\text{GSH}] + K_{\text{GSH}} \cdot [\text{DHA}]}$	$k_{11} = 5.27 \text{ с}^{-1}$ $[\text{DHAR}] = 10^{-7} \text{ М}$ $K_{\text{DHA}} = 2.1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ $K_{\text{GSH}} = 3.5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	[25]
12	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GR}} \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$ $v_{12} = \frac{[\text{GR}] \cdot [\text{GSSG}] \cdot [\text{NADPH}]}{K_1 \cdot [\text{NADPH}] + K_2 \cdot [\text{GSH}]}$	$[\text{GR}] = 1.4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ $K_1 = 2.4 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}$ $K_2 = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}$	[22]
13	$\text{NAD(P)}^+ \xrightarrow{\text{GLUT}} \text{NAD(P)H}$ $v_{\text{GLUT}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADP}^+])}{2 \cdot \left( 1 + \frac{[\text{glc(внешн)}]}{K_{\text{ex}}^m} + \frac{[\text{glc(внешн)}]}{K_{\text{in}}^m} - 2 \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADP}^+]) \right) + \alpha \cdot \frac{[\text{glc(внешн)}] \cdot ([\text{glc(внешн)}] - 2 \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADP}^+]))}{K_{\text{ex}}^m \cdot K_{\text{in}}^m}}$	$V_{\text{max}} = 0.0207 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ $K_{\text{ex}}^m = 1.7 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ $K_{\text{in}}^m = 6.9 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ $\alpha = 0.54$	[19]

Таблица 2. Полная система уравнений в модели

Система уравнений	Начальные значения, М
$[\text{Cat}]'(t) = -v_3 + v_4$	$[\text{Cat}](0) = 5.5 \cdot 10^{-6}$
$[\text{CompI}]'(t) = v_3 - v_4$	$[\text{CompI}](0) = 5.5 \cdot 10^{-6}$
$[\text{H}_2\text{O}_2(\text{внешн})]'(t) = -v_1$	$[\text{H}_2\text{O}_2(\text{внешн})](0) = (1 \dots 1.25) \cdot 10^{-3}$
$[\text{H}_2\text{O}_2]'(t) = v_2 - v_3 - v_4 - v_5 - v_6 - v_7$	$[\text{H}_2\text{O}_2](0) = 0$
$[\text{cytb5}(\text{восст})]'(t) = -v_8 + v_9$	$[\text{cytb5}(\text{восст})](0) = 8.1 \cdot 10^{-6}$
$[\text{cytb5}(\text{окисл})]'(t) = v_8 - v_9$	$[\text{cytb5}(\text{окисл})](0) = 0$
$[\text{MetHb}]'(t) = v_6 - v_7 - v_8 + v_{10}$	$[\text{MetHb}](0) = 0$
$[\text{FerHb}]'(t) = v_7 - v_{10}$	$[\text{FerHb}](0) = 0$
$[\text{Hb}]'(t) = -v_6 + v_8$	$[\text{Hb}](0) = 0.01$
$[\text{Asc}]'(t) = -v_{10} + v_{11}$	$[\text{Asc}](0) = 7.5 \cdot 10^{-5}$
$[\text{DHA}]'(t) = v_{10} - v_{11}$	$[\text{DHA}](0) = 0$
$[\text{GSH}]'(t) = 2(-v_5 - v_{11} + v_{12})$	$[\text{GSH}](0) = 1.5 \cdot 10^{-3}$
$[\text{GSSG}]'(t) = v_5 + v_{11} - v_{12}$	$[\text{GSSG}](0) = 0$
$[\text{NADP}]'(t) = -v_{\text{GLUT}} + v_{12}$	$[\text{NADP}](0) = 0.2 \cdot 10^{-6}$
$[\text{NADPH}]'(t) = v_{\text{GLUT}} - v_{12}$	$[\text{NADPH}](0) = 5 \cdot 10^{-5}$
$[\text{NAD}]'(t) = -v_{\text{GLUT}} + v_9$	$[\text{NAD}](0) = 8.9 \cdot 10^{-5}$
$[\text{NADH}]'(t) = v_{\text{GLUT}} - v_9$	$[\text{NADH}](0) = 1.5 \cdot 10^{-7}$

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали нитрат серебра («ЛенРеактив», Россия) и пероксид водорода (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). Кровь здоровых доноров получали в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Минск, Беларусь). Лейкоцитарный слой и плазму крови отделяли после двукратного центрифугирования при 1500 об/мин. Спектрофотометрические исследования эритроцитов проводили в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2.7 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ D-глюкозы (рН 7.4).

Получение наночастиц проводили с применением методов «зеленой химии» [18]. Раствор нитрата серебра в концентрации 1 мМ смешивали с водным экстрактом растений в соотношении 9 : 1 при рН 8.0 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Окончание синтеза регистрировали по появлению пика на длине волны 400 нм, обусловленного поверхностным плазмонным резонансом. Определение размеров наночастиц проводили спектрофотометрическим методом [26]. Количественные изменения наночастиц в экспериментах выражали через концентрацию ионов серебра ( $[\text{Ag}^0]$ ), необходимую для их синтеза.

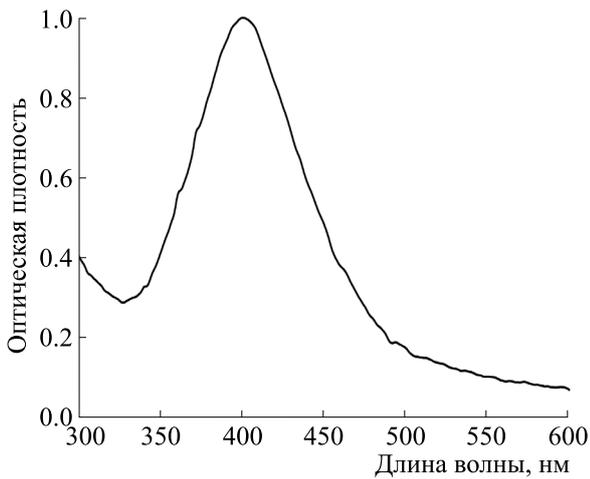
Гемолиз инициировали путем добавления наночастиц серебра или нитрата серебра к суспензии эритроцитов. Кинетику гемолиза эритроцитов измеряли путем регистрации оптической плотности клеточной суспензии (30 млн/мл) на

длине волны 680 нм при температуре 37°C. По окончании гемолиза (через 50 мин для наночастиц и 20 мин – для нитрата серебра) измеряли спектры поглощения гемолизата. Изменение количества клеток оценивали по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 680 нм. Осмотический гемолиз проводили путем инкубирования эритроцитов в растворах с различной концентрацией  $\text{NaCl}$  (48–85 мМ).

Для определения защитного эффекта клетки инкубировали с пероксидом водорода в течение 10 мин до введения гемолизирующего фактора. Защитный эффект определяли по увеличению доли негемолизированных эритроцитов ( $N/N_0$ , где  $N_0$  – начальное количество эритроцитов в суспензии,  $N$  – количество клеток после гемолиза) в присутствии окислителя.

Окисленную форму гемоглобина на мембране эритроцитов определяли спектрофотометрически через 10 мин инкубирования с пероксидом водорода в концентрации 250 мкМ после осмотического разрушения клеток. Продукты гемолиза выделяли центрифугированием в течение 30 мин при 7000 об/мин. Далее записывали спектр поглощения гемолизата на длинах волн 400–450 нм. Измерения проводили с использованием спектрофлуориметра CM-2203 и спектрофотометра UV-VIS PB 2201 (Solar, Республика Беларусь).

Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение среднего для трех–пяти независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность значе-



**Рис. 1.** Спектр поглощения наночастиц серебра. Концентрация серебра 40 мкМ.

ний определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

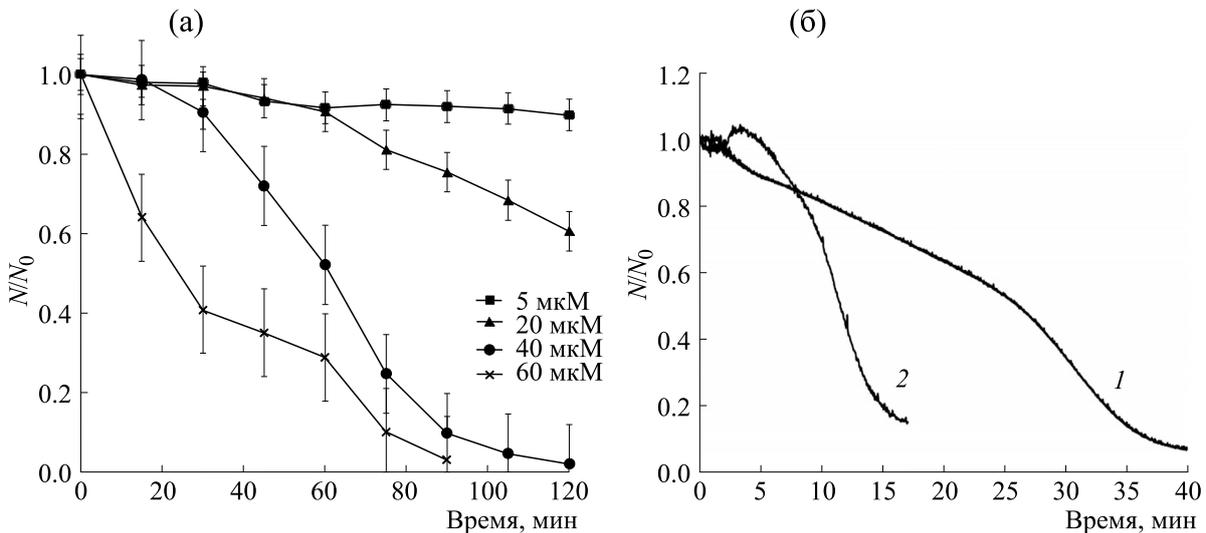
Оптические свойства наночастиц серебра характеризуются наличием в области видимого света ярко выраженной резонансной полосы, называемой полосой поверхностного плазмонного резонанса, положение которой зависит от размера и формы наночастиц [26]. На рис. 1 показан спектр поглощения синтезированных наночастиц серебра. Положение основного максимума на длине

400 нм и шириной менее 100 нм позволяет сделать вывод о том, что частицы мало различаются по размеру и имеют диаметр в среднем 20 нм. Отсутствие дополнительных пиков поглощения говорит о доминировании сферических наночастиц.

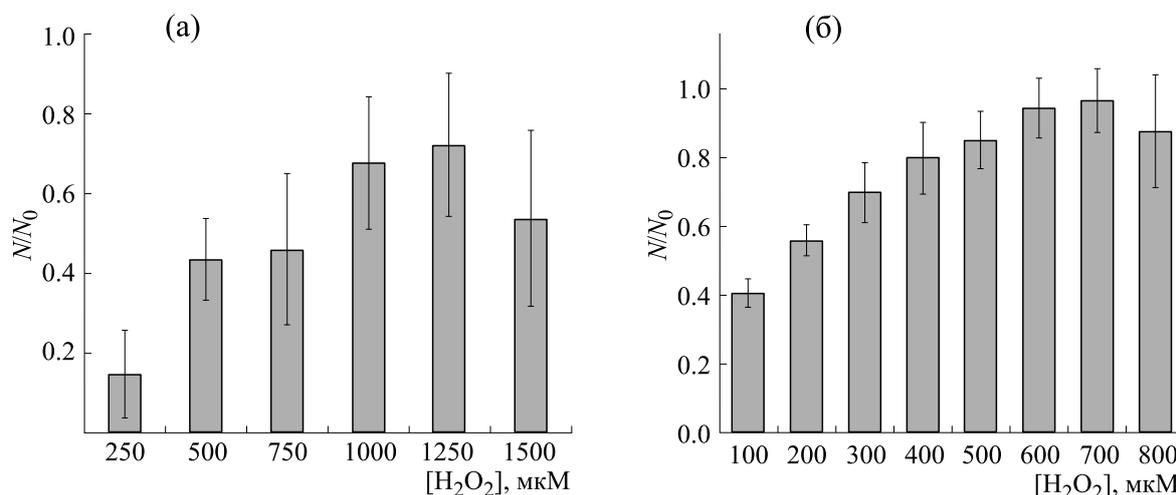
В результате исследований показано, что полученные наночастицы серебра индуцируют гемолиз эритроцитов, скорость которого зависит от суммарной концентрации серебра и содержания ионов в растворе. На рис. 2а представлена кинетика гемолиза эритроцитов наночастицами при концентрации серебра от 5 до 60 мкМ. Как видно из представленных данных, скорость гемолиза увеличивается с ростом концентрации серебра, используемого для синтеза наночастиц. При одинаковой концентрации серебра гемолиз эритроцитов нитратом серебра протекает в два раза быстрее, чем наночастицами (рис. 2б).

Предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода приводит к снижению доли гемолизированных клеток при разрушении наночастицами серебра. Защитный эффект проявляется при концентрации пероксида водорода в диапазоне от 250 до 1500 мкМ. Доля негемолизированных клеток при этом повышается до 0.8 (рис. 3а). При разрушении эритроцитов нитратом серебра защитный эффект пероксида водорода наблюдается при более низких концентрациях, а доля негемолизированных клеток достигает единицы (рис. 3б).

На основе данных по гемолизу эритроцитов определены значения коэффициентов разрушения  $k_p$  и защиты  $k_3$  при разных концентрациях пероксида водорода. Коэффициент  $k_p$  характеризу-

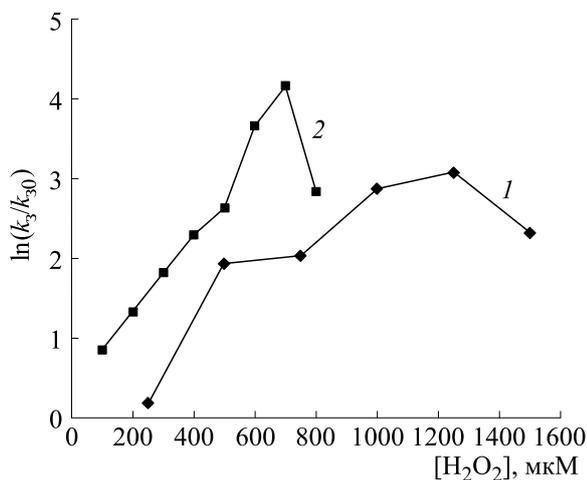


**Рис. 2.** (а) — Кинетика гемолиза эритроцитов наночастицами при разных концентрациях серебра; (б) — кинетические кривые гемолиза эритроцитов наночастицами (кривая 1) и нитратом серебра (кривая 2) при концентрации 100 мкМ.  $N/N_0$  — доля негемолизированных эритроцитов, где  $N_0$  — начальное количество эритроцитов в суспензии,  $N$  — количество клеток после гемолиза.



**Рис. 3.** Зависимость доли негемолизированных эритроцитов от концентрации внеклеточного пероксида водорода при гемолизе наночастицами серебра (а) и нитратом серебра (б).  $N/N_0$  — доля негемолизированных эритроцитов, где  $N_0$  — начальное количество эритроцитов в суспензии,  $N$  — количество клеток после гемолиза.

ет токсическое действие ионов серебра и его значение не зависит от концентрации окислителя, т.е. остается постоянным. Значение коэффициента  $k_3$  зависит от количества мембранных комплексов метгемоглобина, и, следовательно, зависит от концентрации внеклеточного пероксида водорода, при действии которого изменяется количество метгемоглобина и его мембраносвязанной формы. Зависимости значений коэффициента защиты от концентрации пероксида водорода при разрушении наночастицами серебра и нитратом серебра показаны на рис. 4. Как видно из

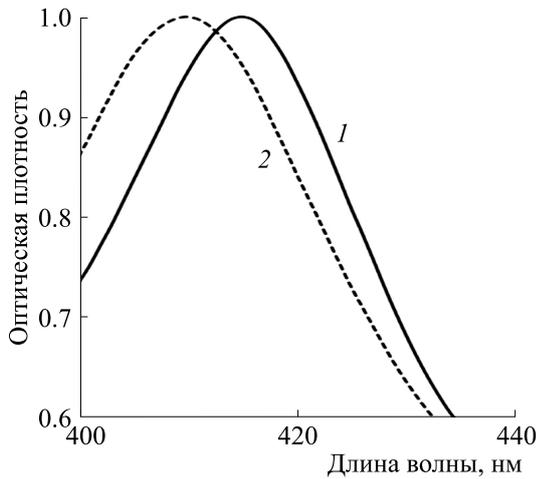


**Рис. 4.** Зависимость коэффициента защиты от концентрации пероксида водорода при гемолизе наночастицами серебра (кривая 1) и нитратом серебра (кривая 2);  $k_3$  — коэффициент защиты при действии пероксида водорода,  $k_{30}$  — коэффициент защиты без пероксида водорода.

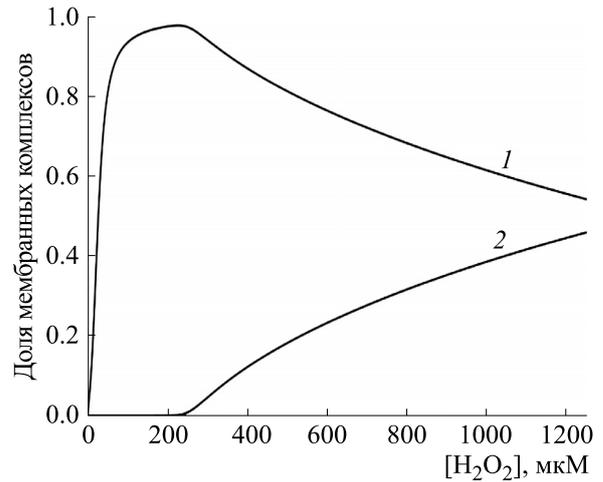
представленных на рис. 4 данных, зависимость значений  $k_3$  от концентрации пероксида водорода является гормезисной: величина коэффициента защиты повышается при низких концентрациях окислителя и снижается при высоких. Различия в значениях коэффициента защиты клеток при действии разных гемолизирующих факторов обусловлены, вероятно, изменением соотношения окисленных форм гемоглобина и их мембраносвязанных форм с течением времени.

Зависимость кинетики связывания окисленных форм гемоглобина с мембраной эритроцитов человека от внутриклеточных и внеклеточных условий изучали на основе предложенной математической модели. В рамках модели считается, что внеклеточный пероксид водорода посредством диффузии через мембрану поступает внутрь клетки, где утилизируется в реакциях с гемоглобином и в реакциях с участием каталазы и глутатионпероксидазы. С ростом начальной концентрации пероксида водорода скорость его диффузии и разложения также увеличивается. При концентрациях ниже 1.5 мМ и количестве клеток 30 млн время утилизации внеклеточного пероксида водорода не превышает 10 мин. Таким образом, после периода предварительного инкубирования (10 мин) внеклеточное взаимодействие между окислителем и наночастицами исключается, а в клетке остаются только продукты реакций окисления.

Окисление гемоглобина приводит к образованию метгемоглобина и феррилгемоглобина, которые обратимо связываются с компонентами эритроцитарной мембраны. Количество мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина при этом зависит от количества



**Рис. 5.** Спектр поглощения гемолизата эритроцитов в контроле (кривая 1) и гемолизата эритроцитов, проинкубированных с пероксидом водорода в концентрации 250 мкМ (кривая 2).



**Рис. 6.** Зависимость доли мембранных комплексов метгемоглобина (кривая 1) и феррилгемоглобина (кривая 2) от концентрации внеклеточного пероксида водорода.

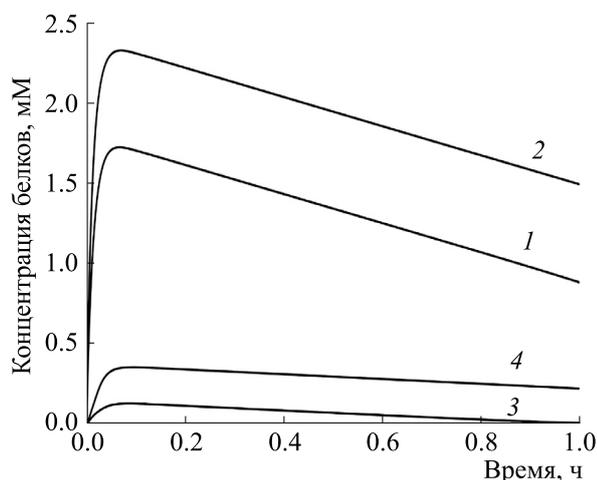
соответствующих белков в цитоплазме. Восстановление окисленных форм гемоглобина осуществляется компонентами антиоксидательной системы эритроцитов. При уменьшении содержания антиоксидантов восстановление замедляется и происходит накопление окисленных форм белка. Согласно расчетам данный эффект реализуется при концентрации внеклеточного пероксида водорода выше 300 мкМ. На рис. 5 представлен спектр поглощения гемоглобиновых комплексов после осмотического разрушения эритроцитов, проинкубированных с пероксидом водорода в концентрации 250 мкМ. В спектре белковых комплексов гемолизата обработанных пероксидом водорода клеток наблюдается смещение максимума с 415 нм к 405 нм, что является признаком накопления метгемоглобина, а не оксигемоглобина на мембране.

В рамках предложенной модели адапционного механизма степень увеличения структурной стабильности мембраны определяется количеством образованных комплексов «мембрана–метгемоглобин» и «мембрана–феррилгемоглобин». Связывание метгемоглобина с мембраной приводит к увеличению структурной стабильности мембраны, при образовании комплексов «мембрана–феррилгемоглобин», напротив, происходит ускорение процессов перекисного окисления липидов и нарушение взаимодействия цитоскелета с мембраной. Количество образованных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина зависит от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования, числа клеток в растворе, состояния антиоксидательной системы эритроцитов, метаболической активности клеток и внешних мета-

болических условий. На рис. 6 представлены зависимости количества мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина от концентрации внеклеточного пероксида водорода. При низкой концентрации пероксида водорода в клетке, как видно из представленных на рис. 6 данных, преимущественно образуются мембранные комплексы метгемоглобина. Снижение пула антиоксидантов в клетке и увеличение концентрации пероксида водорода приводит к росту доли мембранных комплексов феррилгемоглобина.

Пероксид водорода в высоких концентрациях приводит к большему накоплению окисленных форм гемоглобина в клетке. С течением времени общее количество окисленного гемоглобина уменьшается благодаря ферментативному и неферментативному восстановлению. На рис. 7 представлены результаты численных экспериментов по изменению количества образованного метгемоглобина и феррилгемоглобина в клетке при концентрации пероксида водорода 400 и 600 мкМ. Из представленных данных видно, что со временем концентрация окисленных форм гемоглобина снижается в связи с восстановлением. Таким образом, повышение защитных свойств клеток, индуцированное пероксидом водорода, будет уменьшаться со временем.

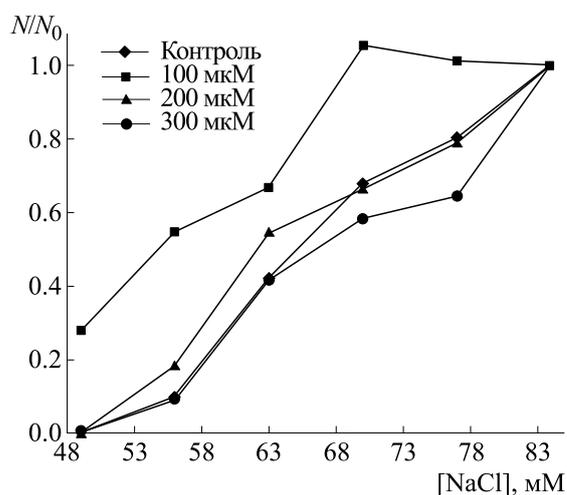
Для более продолжительного сохранения высокой концентрации мембранных комплексов метгемоглобина, необходим пероксид водорода в более высоких концентрациях. В результате при увеличении времени разрушения эритроцитов после воздействия пероксида водорода, положение максимума гормезиса смещается в сторону больших концентраций окислителя. При разрушении эритроцитов наночастицами серебра, бо-



**Рис. 7.** Зависимость индуцированного пероксидом водорода изменения концентрации метгемоглобина (кривые 1 и 2) и ферритингемоглобина (кривые 3 и 4) от времени. Концентрация пероксида водорода 400 мкМ (кривые 2 и 4) и 600 мкМ (кривые 1 и 3).

лее длительном в сравнении с гемолизом нитратом серебра, максимум кривой гормезиса наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ (рис. 3а), тогда как максимум кривой гормезиса при разрушении нитратом серебра — при 700 мкМ (рис. 3б). Сокращение времени гемолиза, наоборот, приводит к смещению максимума гормезиса к более низким концентрациям окислителя. Нами показано, что при осмотическом гемолизе, когда время разрушения составляет меньше минуты, защитный эффект достигает максимума при концентрации пероксида водорода 100 мкМ (рис. 8).

Следует отметить, что скорость повреждения белков при действии наночастиц серебра и нитрата серебра также различается. В растворе оксигемоглобина при соотношении концентраций  $[Hb] : [AgNO_3] = 1 : 10$  нитрат серебра вызывает разрушение белка и накопление агрегатов в течение 1 ч, что приводит к увеличению оптической плотности на длине волны 600 нм в спектре поглощения белка (рис. 9а). На рис. 9б представлен спектр поглощения раствора оксигемоглобина и его изменение при введении наночастиц. Как видно из представленных данных, менее интенсивное взаимодействие наночастиц серебра с оксигемоглобином приводит к образованию агрегатов за 3 ч. Таким образом, более медленное повреждение клеток и белков при действии наночастиц серебра приводит к тому, что для сохранения защитных свойств клеток необходимы более высокие концентрации окислителя, чем при действии нитрата серебра.



**Рис. 8.** Влияние пероксида водорода на зависимость доли негемолизированных эритроцитов от концентрации хлорида натрия в растворе.  $N/N_0$  — доля негемолизированных эритроцитов, где  $N_0$  — начальное количество эритроцитов в суспензии,  $N$  — количество клеток после гемолиза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевым этапом создания эффективных здоровьесберегающих технологий служит понимание механизмов адаптации на молекулярно-клеточном уровне. В настоящей работе на основе численного моделирования и спектроскометрического анализа изучены механизмы регуляции адаптации эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе наночастицами серебра.

Показано, что наночастицы серебра индуцируют гемолиз эритроцитов, скорость которого зависит от общей концентрации серебра и содержания ионов в растворе. Гемолиз эритроцитов нитратом серебра протекает в два раза быстрее, чем наночастицами.

Установлено, что пероксид водорода позволяет снизить долю гемолизированных клеток при разрушении эритроцитов наночастицами серебра и нитратом серебра. В рамках предложенной модели защита клеток при действии пероксида водорода обусловлена окислением гемоглобина, что приводит к образованию мембраносвязанного состояния окисленных форм белка. Окисление гемоглобина оказывает разнонаправленное действие на устойчивость клеток: обратимое связывание метгемоглобина с мембраной приводит к увеличению структурной стабильности мембраны, увеличение концентрации ферритингемоглобина и его связывание с компонентами мембраны приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов и нарушению взаимодействия цитоскелета с мембраной.

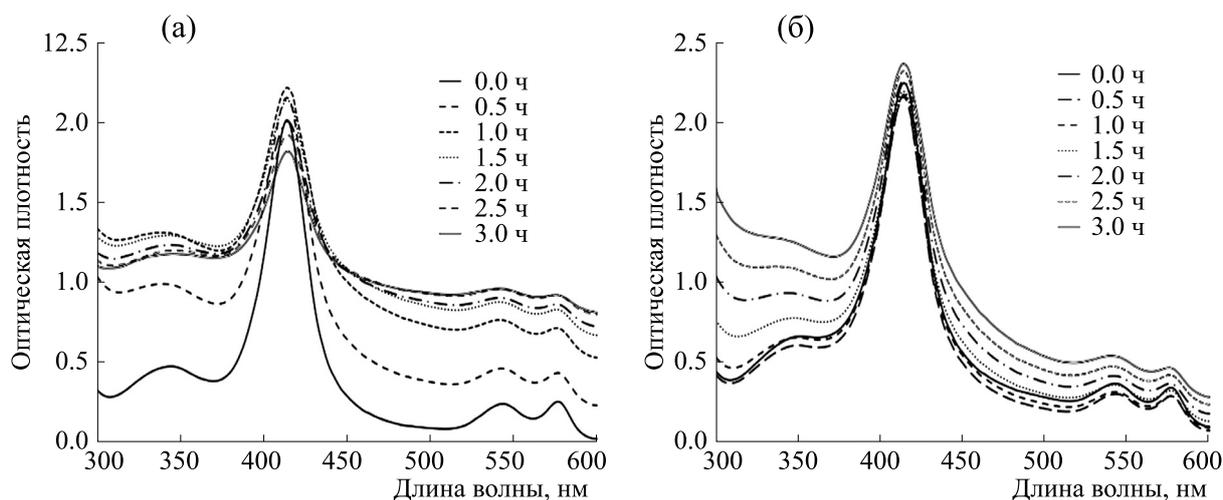


Рис. 9. Изменение спектра поглощения раствора оксигемоглобина во времени при введении нитрата серебра (а) и наночастиц серебра (б).

Показано, что область гормезиса зависит от времени разрушения клеток при действии повреждающего фактора. Максимум кривой гормезиса при разрушении наночастицами серебра наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ, а при разрушении нитратом серебра — при 700 мкМ. На основе численного моделирования установлено, что зависимость максимума кривой гормезиса от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования обусловлена динамическим характером цитоплазматических механизмов, регулирующих соотношение мембранных комплексов метгемоглобинов и феррилгемоглобинов. Таким образом, динамика процессов связывания метгемоглобина и феррилгемоглобина с мембраной играет ключевую роль в способности эритроцитов к защите от разрушения наночастицами серебра и другими повреждающими факторами.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б22-045).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. López-Otín and G. Kroemer, *Cell*, **184** (1), 33–63 (2021).
2. Г. Г. Мартинович, *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы* (БГУ, Минск, 2021).
3. H. Sies and D. P. Jones, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21** (3), 1 (2020).
4. Н. К. Зенков, А. В. Чечушков, П. М. Кожин и др., *Биохимия*, **82** (5), 749 (2017).
5. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Биофизика*, **65** (6), 1081 (2020).
6. A. V. Ulasov, A. A. Rosenkranz, G. P. Georgiev, et al., *Life Sci.*, **291**, 120111 (2021).
7. О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, В. Н. Блиндарь и др., *Прикладная биохимия и микробиология*, **55** (2), 107 (2019).
8. N. Arashiki, N. Kimata, S. Manno, et al., *Biochemistry*, **52**, 5760 (2013).
9. E. M. Welbourn, M. T. Wilson, A. Yusof, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **103**, 95 (2017).
10. L. M. Snyder, N. L. Fortier, J. Trainor, et al., *J. Clin. Invest.*, **76**, 1971 (1985).
11. S. A. Mendanha, J. L. V. Anjos, A. H. M. Silva, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **45**, 473 (2012).
12. A. Kinoshita, Y. Nakayama, T. Kitayama, et al., *FEBS Journal*, **274**, 1449 (2007).
13. P. Jarolim, M. Lahav, S. C. Liu, et al., *Blood*, **76**, 2125 (1990).
14. В. В. Войнаровский и Г. Г. Мартинович, *Биол. мембраны*, **39** (1), 28 (2022).
15. O. Gherasim, R. A. Puiu, A. C. Birca, et al., *Nanomaterials*, **10** (11), 2318 (2020).
16. C. Liao, Y. Li, and S. C. Tjong, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 449 (2019).
17. I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **15**, 2555 (2020).

18. D. He, A. M. Jones, S. Garg, et al., *J. Phys. Chem. C*, **115**, 5461 (2011).
19. H. Holzhütter, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2905 (2004).
20. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биомед. химия*, **51** (6), 626 (2005).
21. R. M. Johnson, G. Jr. Goyette, Y. Ravindranath, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1407 (2005).
22. F. Orrico, M. N. Möller, A. Cassina, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **121**, 231 (2018).
23. L. Gebicka and E. Banasiak, *Acta Biochim. Pol.*, **56** (3), 509 (2009).
24. A. Kinoshita, Y. Nakayama, T. Kitayama, et al., *FEBS Journal*, **274**, 1449 (2007).
25. X. D. Peng, M. P. Washburn, G. P. Sun et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **221** (1), 117 (1996).
26. Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, А. Ю. Оленин и др., *Успехи химии*, **77** (3), 242 (2008).

## **Protective Effect of Hydrogen Peroxide during Erythrocyte Hemolysis by Silver Nanoparticles**

**V.V. Voinarovski and G.G. Martinovich**

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus*

Using numerical modeling and spectrophotometric analysis, mechanisms of regulation of erythrocyte adaptation by hydrogen peroxide during hemolysis by silver nanoparticles were studied. It was shown that silver nanoparticles induce hemolysis of erythrocytes, the rate of which depends on the total concentration of silver and the content of ions in the solution. Hemolysis of erythrocytes by silver nitrate proceeds twice as fast as by nanoparticles. It was found that hydrogen peroxide increases the structural stability of erythrocytes during hemolysis by silver nanoparticles and silver nitrate. The concentration range for hydrogen peroxide, within which the proportion of non-hemolyzed cells (hormesis region) increases, depends on the time of cell destruction due to a damaging factor. The maximum hormetic effect after treatment of cells with silver nanoparticles is observed at the hydrogen peroxide concentration of 1250  $\mu\text{M}$ , and after treatment of cells with silver nitrate, at 700  $\mu\text{M}$ . Based on numerical modeling, it was established that the maximum hormetic effect depends on the concentration of extracellular hydrogen peroxide and the incubation time due to the dynamics of the cytoplasmic mechanisms that regulate the ratio of membrane complexes of methemoglobin and ferryl-hemoglobin.

*Keywords: hormesis, adaptation, hydrogen peroxide, erythrocytes, methemoglobin, silver nanoparticles*